第34卷 第1期 昆 虫 学 报 Vol. 34, No. 1
1991年2月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Feb., 1991

羧酸酯酶和酸性磷酸酯酶在抗有机磷和敏感淡色库蚊发育期的变化

唐振华 韩启发 庄佩君
(中国科学院上海昆虫研究所，上海 200025)

摘要 本文研讨羧酸酯酶(CarE)和酸性磷酸酯酶(ApE)在抗马拉硫磷(RM)、抗敌百虫(RD)和敏感(S)品系淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 不同发育期中的变化，以及某些杀虫剂和抑制剂对 α-醋酸萘酯羧酸酯酶(α-NA CarE)的抑制作用。RD 和 S 品系不同发育期的 ApE 变化情况如下：(1) RD 和 S 品系间无明显差异；(2)幼虫发育期的 ApE 水平较低，而在变态期的 ApE 活性突然上升为最高，表明 ApE 可能参与蚊虫的发育和分化。RM、RD 和 S 品系的CarE水平在幼虫期随虫龄增长而增高。RM 和 S 品系的 CarE 活性比维持在 20—35 倍，RD 品系在 10—25 倍，但三个品系的 CarE 活性在变态期突然下降。新羽化成蚊的 CarE 活性出现一个很高的峰。羽化后十天内 CarE 活性有一定的波动，十天后 CarE 活性逐渐下降，但仍高于幼虫期和蛹期。此外还讨论了对氧磷、敌敌畏、速灭威、毒扁豆碱、TPP 和异稻瘟净对 RM、RD 和 S 品系 α-NA CarE 的抑制作用。

关键词 淡色库蚊 羧酸酯酶 酸性磷酸酯酶 抗性 马拉硫磷 敌百虫

因解毒酶活性增高而代谢杀虫剂的能力增强的代谢抗性中，除了微粒体氧化酶(MFO_s)和谷胱甘肽 S-转移酶(GSH/ases)外，水解酶起着很重要的作用。有机磷抗性涉及的水解酶主要是羧酸酯酶(CarE)和酸性磷酸酯酶(ApE)(唐振华、黄刚，1982)。此外，酸性磷酸酯酶(ApE)还常作为溶酶体的标志。尽管它的生理意义还不清楚，但高活性的 ApE 很可能涉及昆虫的发育和分化(Mills 和 Lang，1972)。所以 ApE 不但与抗性有关，而且还与昆虫的发育和分化有关。

淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 对马拉硫磷(唐振华等，1980a、1980b；唐振华和黎云根，1985；唐振华，1986)和敌百虫(陈巧云等，1980；姜家良等，1980)的抗性机理研究表明，CarE 的活性增高与抗性发展的程度呈平行关系。遗传学研究表明，马拉硫磷抗性为单因子、不完全显性(黎云根和唐振华，1982—1983、1984)，而敌百虫抗性为多因子遗传(张朝远等，1982—1983)。ApE 与马拉硫磷抗性(唐振华等，1980a，1980b、1986)和敌百虫抗性(陈巧云等，1980)的关系不大。Heimingway (1985) 发现在按蚊 *Anopheles arabiesis* 中抗性仅出现于成虫，而幼虫期并不表现抗性。在淡色库蚊中虽然幼虫和成虫对马拉硫磷都表现很高的抗性(唐振华，1986)，但在各个发育历期中酯酶变化的情况尚不清楚。本研究旨在了解抗马拉硫磷、抗敌百虫和敏感品系在各个发育历期中 CarE 和 ApE 活性的变化，从而进一步分析与抗性的关系。此外，还就几种抑制剂对不同品系的 α-醋酸萘酯羧酸酯酶的抑制作用进行了初步研究，试图了解不同品系中 α-NA CarE 的性质。

本文于 1988 年 10 月收到。
文内插图由林爱莲同志覆墨，特此致谢。

材料和方法

一、供试试剂

马拉硫磷(95.5%)、敌百虫(98.0%)、异稻瘟净(IBP)(92.0%)分别由宁波农药厂、上海农药厂和嘉兴农药厂提供;磷酸三苯酯(TPP)化学纯,上海试剂总厂提供;敌敌畏(97.3%)及毒扁豆碱纯品,分别为德国 Bayer 公司和 Fluka 公司提供。对氧磷(99.0%)系英国 R. J. Wood 教授赠送。

二、供试昆虫品系

1. 敏感品系(S) 对原有长期饲养于室内不接触任何药剂的 SEN 品系进行单卵块选育而成。

2. 抗马拉硫磷品系(RM) 1978 年采集于江苏无锡市郊,携回室内饲养一年后进一步用马拉硫磷选育。

3. 抗敌百虫品系(RD) 来源同2。用敌百虫选育而成。

三、选育方法和生物测定

详见唐振华等(1980)。测定数据用 Finney 机率值分析编制的程序在 IBM PC/XT Super 机上求出 LD-p 线、LD_{50} 及 95% 可信限和 χ^2 等。

四、α体酯酶活性测定

1. 酶源制备 取不同发育历期幼虫、雌蛹及雌成虫 50—200 头,用蒸馏水冲洗 3 次,吸干后加入一定量重蒸馏水于冰浴中匀浆,离心(3500 转/分)10 分钟,取上清液作酶源。

2. 蛋白质测定 用 Lowry 等(1951)的方法。

3. 羧酸酯酶的测定 以 α-醋酸萘酯(α-NA)为底物参照 Van Asperene (1962) 方法。

4. 磷酸酯酶的测定 参照 Bessay 等(1946)的方法。

5. 抑制作用的测定 参照以上羧酸酯酶的测定方法,先加一定量的抑制剂摇匀,抑制 5 分钟后再加底物。每组至少重复 3 次。

结 果

一、生物测定

各品系对马拉硫磷和敌百虫的敏感度见表 1。RM 品系 F_{115} 代对马拉硫磷的抗性是 S 品系的 238 倍,RD 品系 F_{98} 和 F_{117} 代对敌百虫的抗性分别是 S 品系的 265 和 232 倍。因为从 F_{98} 到 F_{117} 代曾中止选育,故抗性略有下降。

二、S 和 RD 品系发育过程中酸性磷酸酯酶活性的变化

从卵孵化当天到蛹羽化后 25 天的 S 和 RD 品系(F_{98} 代)的幼虫及雌成虫(共约 30 天),其发育过程中 ApE 活性的变化如图 1 所示。纵观整个发育过程中幼虫期和蛹期 RD 的 ApE 活性比 S 品系低。其相对活性比(R 品系的酶活性/S 品系的酶活性)约为 0.5,即仅为 S 品系的二分之一,而成虫期无明显差异。无论是 S 还是 RD 品系,蛹期的 ApE 活性是整个发育过程中最高的时期。羽化后一直维持在较为稳定的水平。

三、S、RM 和 RD 品系发育过程中羧酸酯酶活性的变化

RM 品系 F_{115} 代和 RD 品系 F_{117} 代不同发育时期的 CarE 活性变化见图 2A。

表1　RM、RD 和 S 品系对马拉硫磷和敌百虫的敏感度

品系		药剂	LC_{50} (ppm)	回归式 Y =	抗性倍数	95% 置信限	χ^2
S		马拉硫磷	0.0366	12.2534 + 5.0500x	1.0	0.0346—0.0380	2.4
		敌百虫	0.0678	11.3098 + 5.4000x	1.0	0.0645—0.0714	2.2
RM (F_{115})		马拉硫磷	8.7115	2.3141 + 2.8570x	238.0	7.8633—9.6511	0.5
RD	F_{98}	敌百虫	17.9840	−5.9000 + 8.6861x	265.3	17.0910—18.9200	5.4
	F_{117}	敌百虫	15.7709	−3.4500 + 7.0600x	232.6	15.0740—16.5000	3.5

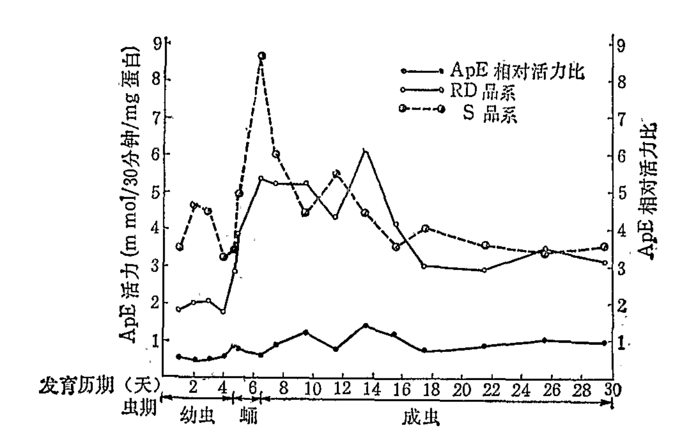


图1　RD 和S品系不同发育期 ApE 活性及其相对活力比的变化

在S及 RM 品系中幼虫期 CarE 的活性随发育历期的增长而增强，RD 品系则比较平缓，但都表现了与发育历期的正相关性。4龄期的幼虫均表现了较高的 CarE 活性水平，蛹期则突然下降形成波谷。特别是在S品系中，4 龄幼虫为整个发育过程中活性最高

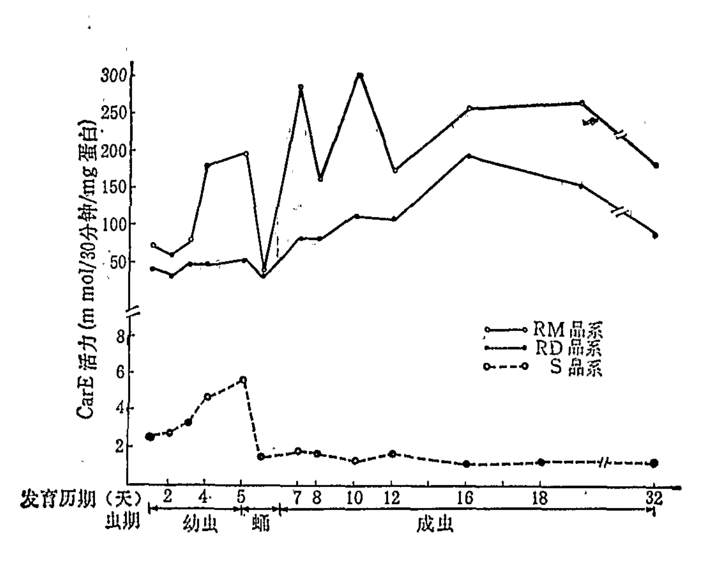


图2A　RM、RD 和S品系不同发育期的 CarE 活性变化

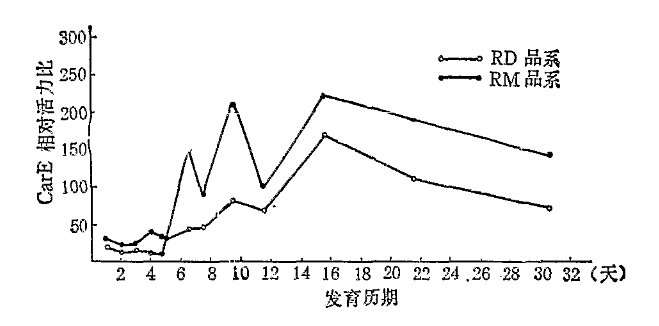


图 2B RM 和 RD 品系不同发育期 CarE 相对活力比的变化
(相对活力比 = R 品系的 CarE 活性/S 品系的 CarE 活性)

的时期,蛹期迅速下降至 4 龄幼虫末期的 25.6%,成虫期趋于与蛹一致,保持很低的酶活性水平。抗性品系的蛹期 CarE 活性也下降至整个发育过程的最低点. RM RD 分别下降至 4 龄幼虫末期的 24.6% 和 70.7%。但抗性品系的成虫阶段也表现了较高的酶活性水平。特别是 RD 品系随发育历期的增长酶活力逐渐上升,在羽化后十天的成虫出现波峰。羽化十天后抗性品系的成虫酶活性水平出现平缓下降,但总体酶活力水平仍维持很高。

从图 2B RM 和 RD 品系各发育阶段 CarE 活性对 S 品系的相对活性比的变化可以看出,RM 和 RD 品系在幼虫阶段都比较稳定,RM 品系的活性比 S 品系高 20—35 倍,RD 品系比 S 品系高 9—20 倍,而 RM 的活性要比 RD 高得多。抗性品系羽化后十天内成虫的 CarE 活性要比幼虫期和蛹期高得多,但不是恒定的,而具有一定的波动,RM 品系尤为明显。RM 品系的 CarE 活性约为 S 品系的 100—225 倍,RD 品系仅为 50—180 倍。羽化十天以后的羧酸酯酶活性比虽然逐渐下降,但还是大大高于幼虫期和蛹期。

四、不同的抑制剂对 α-NA CarE 的抑制作用

图 3A、B 和 C 分别表示毒扁豆碱、速灭威、对氧磷、敌敌畏、TPP 和 IBP 对 S、RM 和 RD 品系 4 龄幼虫 α-NA CarE 活性的抑制作用。对氧磷和敌敌畏对三个品系都有

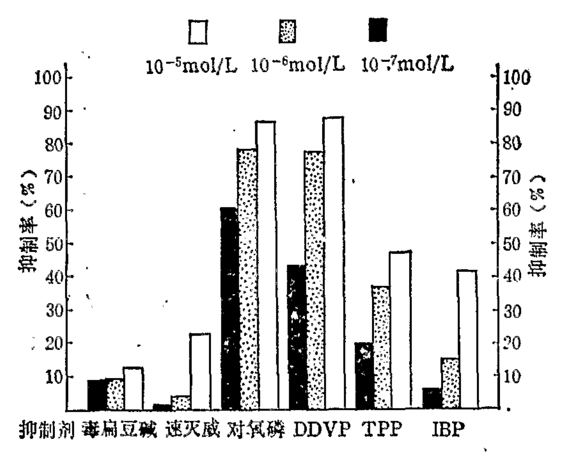


图 3A 不同抑制剂对 S 品系 α-NA CarE 的抑制作用

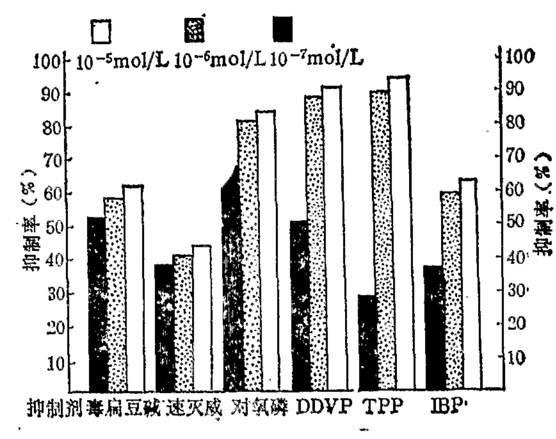


图 3B 不同抑制剂对 RM 品系 α-NA CarE 的抑制作用

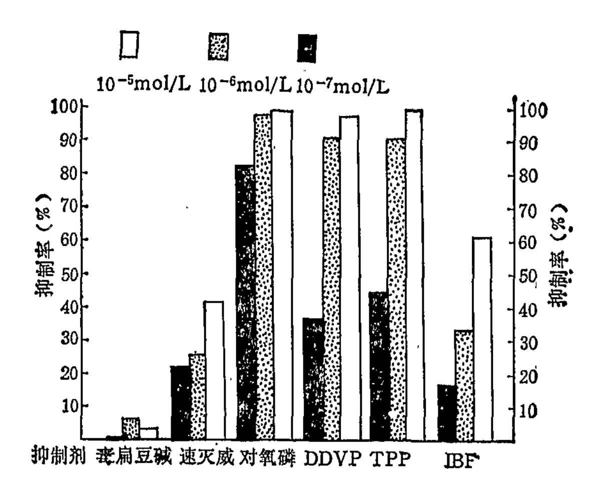


图 3C　不同抑制剂对 RD 品系 α-NA CarE 的抑制作用

很强的抑制作用；毒扁豆碱对 RM 的 α-NA CarE 的抑制作用大于 RD 和 S 品系；速灭威的抑制作用大小顺序是 RM > RD > S；而 TPP 和 IBP 对抗性品系具有明显的抑制作用，但 TPP 的抑制作用要比 IBP 强得多。

讨　论

RD 和 S 品系在各个发育阶段 ApE 活性较低而在幼虫期 RD 反而稍低于 S 品系(见图1)。这表明 ApE 在各个发育期与抗性的关系不大。但 RD 和 S 品系蛹期的 ApE 活性都达到了最高水平，羽化后迅速下降至第 8 天又出现了一个高峰，然后稳定在一个较高水平。幼虫期的 ApE 水平较低而在变态(蛹)和成虫期的 ApE 水平较高，变态蛹期的 ApE 水平最高。表明 ApE 涉及蚊虫的发育和分化。这种情况在家蝇 (Barker 和 Alexander, 1958)、家蚕 (Lockshin 和 Williams, 1965; Sridhara 和 Bhat, 1963)及埃及伊蚊 (Mills 和 Lang, 1972) 中都曾有报道。

RM 对马拉硫磷和 RD 对敌百虫的抗性水平相差不大，而在幼虫期和成虫期的 CarE 活性是 RM ≫ RD 品系。这可能与它们的抗性机理不同有关。RM 的抗性仅与 CarE 活性的增高有关，与表皮穿透无关；而 RD 的抗性除了与 CarE 活性增高有关外，还与表皮穿透作用降低有关(唐振华等，1980)。RD 的抗性水平至少是这两个因子相互作用的结果。

TPP 和 IBP 对 α-NA CarE 离体抑制作用的结果与活体的增效作用结果是一致的。TPP 对 RD 和 RM 分别增效 5.9 和 54.5 倍(唐振华等，1980；唐振华，1986)，IBP 对 RD 增效 3.05 倍(唐振华等，1980)。但 TPP 对 RM 的增效倍数要比对 RD 的增效倍数高得多，而对两者的离体相对抑制作用却无明显差异。这可能是活体和离体不同的处理条件引起。活体试验的过程中药剂要经过表皮穿透、代谢(活化或解毒)，然后到达靶标部位。由于表皮穿透降低也是 RD 对敌百虫的抗性机理之一，而该因子是无专一性的，所以 RD 品系可能对 TPP 的表皮穿透作用也低于 RM 品系，即使进入体内后 TPP

本身也有可能被代谢，因而造成离体与活体试验获得不一致的结果。

为了便于比较，现将这些抑制剂对 RM、RD 和 S 品系 α-NA CarE 的抑制作用转换成相对抑制强度(即以 S 品系的抑制作用为标准)。结果见表 2。对氧磷和敌敌畏是抑制谱比较广的抑制剂。既能抑制 CarE 又能抑制乙酰胆碱酯酶 (AchE)，因而对三个品系都有很强的抑制作用。值得注意的是毒扁豆碱对 RM 的 α-NA CarE 抑制作用要比 S 品系高 5—6 倍。而对 RD 品系反而比 S 品系低。以前用硫代乙酰胆碱作底物测得 RM 雌成虫的 AchE 活性为 S 品系的 0.68 倍(唐振华，1986)。黄刚等(1988)发现淡色库蚊从卵期胚胎发育时在电泳图谱上已有一条弱的 AchE 带，并发现 RD 和 S 品系在卵、幼虫、蛹和成虫等不同发育期的 AchE 同工酶谱和活性是不同的。所以对不同发育期的 AchE 的抑制作用出现差异。由于 AchE 存在多种形式，它们对不同底物的敏感度也可能不同，即 AchE 可能存在质的差异。

表 2 几种抑制剂对抗性品系的相对抑制作用

抑制剂 \ 品系 / 抑制剂浓度	RM			RD		
	10⁻⁷ mol/L	10⁻⁶ mol/L	10⁻⁵ mol/L	10⁻⁷ mol/L	10⁻⁶ mol/L	10⁻⁵ mol/L
毒扁豆碱	6.0	6.3	4.9	0.0	0.7	0.2
速灭威	24.0	10.4	2.0	14.1	6.5	1.9
对氧磷	1.1	1.1	1.0	1.4	1.2	1.1
敌敌畏	1.2	1.2	1.0	0.9	1.2	1.1
TPP	1.4	2.5	2.0	2.3	2.5	2.1
IBP	5.8	3.9	1.5	2.6	2.2	1.5

如上所述，ApE 在发育变态阶段(蛹期)的活性最高，而 CarE 却相反，在变态阶段活性突然下降出现一个低谷，到成虫期又迅速上升。这可能是由于抗性基因在蛹期并不表达或表达作用很低，从而使 CarE 活性迅速下降。在用杀虫剂对 4 龄幼虫选育时也发现许多存活的 4 龄幼虫在蛹期大量死亡。这是由于蛹期 CarE 活性迅速下降，而导致对杀虫剂的敏感性提高。不管怎样，在防治中，特别是对有机磷有抗性的蚊虫，选择蛹期或低龄幼虫是可取的。

参 考 文 献

张朝远等 1982—1983 淡色库蚊抗敌百虫品系的遗传研究。昆虫学研究集刊 第三集 99—104 页。上海科技出版社。
陈巧云等 1980 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶同敌百虫抗性关系。昆虫学报 23(4): 350—7。
姜家良等 1980 抗有机磷淡色库蚊的羧酸酯酶研究。昆虫学研究集刊 第一集 69—76 页。上海科技出版社。
唐振华等 1980a 淡色库蚊对敌百虫的抗药性研究——抗性谱及联合作用。昆虫学报 23(3): 276—85。
唐振华等 1980b ¹⁴C-马拉硫磷在抗性和敏感淡色库蚊中的表皮穿透作用和代谢。昆虫学研究集刊 第一集 83—88 页。上海科技出版社。
唐振华、黄刚 1982 农业害虫抗药性。农业出版社。北京。
唐振华、黎云根 1985 马拉硫磷和敌百虫混用和轮用的研究，淡色库蚊的酯酶同工酶与抗性的关系。昆虫学报 28(2): 135—41。

唐振华　1986　淡色库蚊的马拉硫磷抗药性及其机理的研究。昆虫学研究集刊 第六集　115—122 页。上海科技出版社。

黄刚等　1988　淡色库蚊敏感品系与敌百虫抗性品系乙酰胆碱酯酶同工酶在发育过程中的变化。 遗传学报　15: 129—37。

黎云根、唐振华　1982—1983　抗马拉硫磷淡色库蚊的形式遗传研究。昆虫学研究集刊 第三集　85—92 页。上海科技出版社。

黎云根、唐振华　1984　抗马拉硫磷淡色库蚊的生化遗传研究。昆虫学研究集刊　第四集　127—131 页。上海科技出版社。

Barker, R. J. & B. H. Alexander 1958 Acid and alkaline phosphatase in houseflies of different ages. *Ann. Ent. Sco. Am.* **51**: 255—7.

Bessey, O. A. et al 1946 A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**: 321, 329.

Heimingway, J. 1985 Malathion carboxylesterase enzyme in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**: 309—13.

Lockshin, R. A. & C. M. Williams 1965 Programmed cell death——V Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J. Insect Physiol.* **11**: 831—44.

Lowry, O. H. et al 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—75.

Mills, B. J. MS & C. A. Lang, ScD 1972 Acid phosphatase profile during the life span of the mosquito. *J. Ceorntol.* **27**: 333—7.

Sridhara, S. & J. V. Bhat 1963 Alkaline and phosphatases of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect physiol.* **9**: 693—701.

Van Asperen, K. 1962 A study of housefly esterases by means of a sensitive coloretric menthod. *J. Insect Physiol.* **8**: 401—16.

CARBOXYLESTERASE AND ACID PHOSPHATASE PROFILE DURING THE LIFE-SPAN OF THE OP-RESISTANT AND SUSCEPTIBLE *CULEX PIPIENS PALLENS*

TANG ZHEN-HUA　HAN QI-FA　ZHUANG PEI-JUN

(*Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai* 200025)

The present paper deals with carboxylesterase (CarE) and acid phosphatase (ApE) profile during the life-span of the malathion-resistant (RM) and trichlorfon-resistant (RD) and susceptible (S) *Culex pipiens pallens*, and the inhibition of α-naphthyl acetate (α-NA) CarE by some insecticides and inhibitions. It was found that the ApE profile during the life-span of RD and S strains exhibited the following characteristics: 1. there was no significant difference between RD and S strains, and 2. low levels of ApE activity were found in the larval stages while high levels were observed during metamorphosis. It suggested its possible involvement in development and differentiation, but not in insecticide resistance. CarE levels in RM, RD and S strains increased with age in the larval stages. The CarE ratio of R to S stains reached to 20—35 folds for the RM stain and 10—25 folds for the RD strain, but the CarE level of all the three strains abruptly decreased during metamorphosis. A peak of very high activity occurred in the newly emerged adult. There were some variations of the CarE level within 10 days after emergence, and then the CarE activity decreased gradually, but still higher than the levels in larval and pupal stages. The inhibition of the α-NA CarE from RM, RD and S strains by paraoxon, DDVP, MTMC, eserine, TPP and IMP is also discussed.

Key words *Culex pipiens pallens*——carboxylesterase——acid phosphatase——insecticide resistance——malathion——trichlorfon